

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina RIEBEL et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: RECOMBINANT ENZYMES HAVING IMPROVED NAD (H) AFFINITY

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

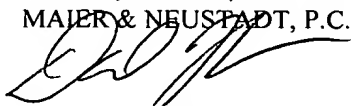
| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NUMBER</u> | <u>MONTH/DAY/YEAR</u> |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| GERMANY | 100 37 101.9 | JULY 27, 2000 |

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.
Registration No. 45,518



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 37 101.9

Anmeldetag: 27. Juli 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
(vormals: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE)

Bezeichnung: Rekombinant hergestellte Enzyme mit verbesserter
NAD(H)-Akzeptanz

IPC: C 12 N 9/04

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehrer

Rekombinant hergestellte Enzyme mit verbesserter NAD(H)- Akzeptanz

Die vorliegende Erfindung ist auf ein rekombinant (rec) hergestelltes Enzym gerichtet. Insbesondere betrifft die Erfindung ein solches Enzym, bei dem die NAD(H)-Akzeptanz gegenüber dem Wildtyp erhöht ist. Weiterhin umfaßt die Erfindung die für das rec-Enzym codierenden Gensequenzen, Plasmide und Mikroorganismen, die diese Gensequenzen aufweisen, vorteilhafte Primer, ein Verfahren zur Herstellung der Enzyme und deren Verwendung.

Der Einsatz enzymatischer Verfahren in der Synthese von organischen Verbindungen ist gerade im großtechnischen Maßstab von Vorteil, da sie in Bezug auf die Selektivitäten und Ausbeuten an Produkten den normalen chemischen Verfahren häufig überlegen sind.

U.U. sind derartige enzymatische Verfahren abhängig von sogenannten Co-Faktoren oder Coenzymen. Z.B. sind Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) Enzyme, die mit hoher Enantioselektivität Ketone zu den entsprechenden Alkoholen umsetzen. Coenzym solcher Reaktionen ist sehr häufig NADH oder NADPH. Die meisten bekannten ADHs (z.B. aus Pferdeleber, dem Bakterium *Thermoanaerobium brockii*) bilden bei Verwendung vergleichbarer Ketone (S)-Alkohole. Aus *Lactobacillus*-Stämmen sind allerdings zwei (R)-spezifische ADHs bekannt, die sich biochemisch stark ähneln, ein Enzym aus *Lactobacillus kefir* (EP 91107067.0; DE 4014573) und eins aus *L. brevis* (EP 0 796 914 A2; DE 196 10 984; DSM 20054).

Eine Einschränkung bei der Verwendung dieser beiden R-spezifischen Enzyme besteht durch die Abhängigkeit vom Coenzym NADP(H). Dieses Coenzym ist beträchtlich instabiler und teurer als das Coenzym NAD(H), zudem existieren keine etablierten und kostengünstigen Regenerierungsverfahren. Wegen der ungewöhnlich breiten Akzeptanz an Ketonen, die von diesen Enzymen praktisch völlig enantiomerenrein umge-

setzt werden, sind sie aber für präparative Anwendungen von großem Interesse.

Bei in der Literatur beschriebenen Versuchen, die Coenzym-Spezifität von NADP(H) in Richtung NAD(H) zu verschieben, wurden bislang überwiegend „multiple“ Austausche größerer Bereiche vorgenommen, die keine systematische Vorgehensweise erkennen lassen und nicht auf andere NADP(H)-abhängige Enzyme übertragbar sind (Chen, R. et al. (1995) "A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92(25): 11666-70; Perham, R. N. et al. (1991). "New enzymes for old: redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase." Bioessays 13(10): 515-25; Yaoi, T. et al. (1996). "Conversion of the coenzyme specificity of isocitrate dehydrogenase by module replacement." J. Biochem. (Tokyo) 119(5): 1014-8). Lediglich eine Publikation (Sem, D. S. and C. B. Kasper (1993) "Interaction with arginine 597 of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase is a primary source of the uniform binding energy used to discriminate between NADPH and NADH." Biochemistry 32(43): 11548-58) beschreibt einen singulären Austausch an einer Dehydrogenase (Cytochrom P450-Oxidoreduktase), allerdings wurde dieser in analoger Weise zu W099/47648 durchgeführt. Die Autoren haben den Austausch einer basischen Aminosäure gegen eine neutrale (Arg597Met) vorgenommen. Die Ergebnisse der Autoren bestätigen eine leichte Verbesserung der NAD-Akzeptanz, doch ist das erhaltene Enzym deutlich instabiler.

Es wurde weiterhin versucht, das Enzym aus *L. brevis* mit gentechnischen Methoden derart zu verändern, daß es neben NADP(H) auch NAD(H) akzeptiert (W099/47648). Um diese Änderung in der Coenzym-Akzeptanz zu erreichen, wurden dort im wesentlichen basische Aminosäuren in der Coenzym-Bindungsstelle gegen neutrale ausgetauscht. Dieser Austausch wurde durch Änderung der Nucleotid-Sequenz erreicht,

- die die (R)-ADH aus *L. brevis* kodiert. So wurden im Bereich der Coenzym-Bindungsstelle in verschiedenen Kombinationen die basischen Aminosäuren Arginin-38, Lysin-45 und Lysin-48 gegen neutrale (z.B. Methionin, Leucin, Isoleucin, Glycin) ausgetauscht (Dabei handelt es sich um AS-Positionen inklusive des Startcodons ATG). Solche Mutanten des Enzyms akzeptieren zwar tatsächlich auch NAD(H), erwiesen sich aber für eine Anwendung als wenig tauglich, da die Enzymausbeuten relativ gering und vor allem die Stabilitäten dieser neuartigen Enzyme im Vergleich zum NADP(H)-abhängigen Wildtyp-Enzym stark herabgesetzt waren. Auch eine weitere Mutante, bei der zusätzlich zu den oben erwähnten Austausch basischer Aminosäuren gegen neutrale (Austausche R39L, K48M sowie der Ladungs-neutrale Austausch A9G) auch ein zusätzlicher Austausch einer neutralen gegen eine saure Aminosäure (G38D) vorgenommen wurde, zeigte zwar eine Erweiterung der Coenzym-Akzeptanz in Richtung NAD(H), war aber ebenfalls beträchtlich instabil und nur mit geringen Ausbeuten zu gewinnen.
- 20 Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war deshalb die Angabe eines allgemeinen Verfahrens und der mithilfe dieses Verfahrens gewonnenen Enzyme, welches es gestattet, bei einer zumindest nicht wesentlichen Verschlechterung der Stabilität der Enzyme, deren eigentlich unnatürliche NAD(H)-Akzeptanz zu vergrößern.

- Diese Aufgabe wird durch Angabe der rec-Enzyme mit den kennzeichnenden Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Ansprüche 2 bis 4 stellen bevorzugte rec-Enzyme unter Schutz. Ansprüche 5 bis 8 richten sich auf die für diese rec-Enzyme codierenden Gensequenzen, Plasmide und Mikroorganismen aufweisend diese Gensequenzen sowie bevorzugte Primer. Ansprüche 9 bis 11 stellen das erfindungsgemäße Verfahren vor, wohingegen Ansprüche 12 und 13 bevorzugte Verwendungen der rec-Enzyme kennzeichnen.

Dadurch, daß man unter Beibehaltung der basischen Aminosäuren in der Coenzymbindungsstelle des Enzyms mindestens eine neutrale Aminosäure gegen mindestens eine saure austauscht, erhält man ein rekombinant hergestelltes Enzym mit gegen-
5 über dem Wildtyp erhöhter NAD(H)-Akzeptanz.

Die vormals vorhandenen natürliche Präferenz für das instabile Coenzym NADP(H) kann also durch den Austausch nur einer Aminosäure in Richtung der bevorzugten und vorteilhaften NAD(H)-Akzeptanz verschoben werden. Dies ist so aus dem
10 Stand der Technik nicht zu entnehmen und mithin sehr überraschend. Im Experiment hat sich gezeigt, daß die Akzeptanz für NAD(H) gegenüber NADP(H) in der erfindungsgemäßen Mutante durch diesen Austausch ca. um den Faktor 300 gesteigert werden kann, ohne die Stabilität des rec-Enzyms zu
15 verschlechtern. Im Gegenteil wird die Temperaturstabilität noch erhöht.

Mithilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können im Prinzip alle dem Fachmann bekannten NADP(H)-abhängigen Enzyme entsprechend getuned werden. Bevorzugt handelt es sich dabei
20 um eine Dehydrogenase, vorzugsweise eine Alkoholdehydrogenase. Weiterhin vorzugsweise erfolgt dies jedoch bei der (R)-ADH aus *L. brevis* oder *L. kefir*. Man erhält so vorteilhafte rec-(R)-ADHs aus besagten Organismen mit den oben angesprochenen Vorteilen. Ganz besonders bevorzugt sind solche
25 rec-(R)-ADHs aus *L. brevis* oder *L. kefir*, bei denen an Position 38 ein G gegen ein D als Aminosäure ausgetauscht ist. Bei der Positionsangabe ist die Startaminosäure entsprechend dem Codon ATG mitgezählt.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung beschäftigt
30 sich diese mit Gensequenzen, welche für eine erfindungsgemäße rec-Enzym codieren.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Plasmide und Mikroorganismen, welche die erfindungsgemäßen Gensequenzen aufweisen.

35 Der Mikroorganismus, in den die Gensequenz kloniert wird,

dient zur Vermehrung und Gewinnung einer ausreichenden Menge des rekombinanten Enzyms. Die Verfahren hierfür sind dem Fachmann wohlbekannt (Sambrook et al. 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Balbas P & Bolivar F. 1990, Design and construction of expression plasmid vectors in E.coli, Methods Enzymology 185, 14-37). Als Mikroorganismen können im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommende Organismen herangezogen werden. Vorzugsweise sind E. coli-Stämme für diesen Zweck zu benutzen. Ganz besonders bevorzugt sind: E. coli NM 522, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10⁻ oder HB101. Plasmide, mit denen die erfindungsgemäße Gensequenz aufweisende Genkonstrukt vorzugsweise in den Wirtsorganismus kloniert wird, sind: pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac (Roche Biochemicals), pKK-233 (Stratagene) oder pET (Novagen). Weitere sind dem Fachmann im Prinzip ebenfalls bekannt (s.o.a. Literatur, ansonsten immer die entsprechenden molekularbiologischen Fachkataloge).

Die für die PCR notwendigen Primerstränge bilden einen weiteren Teil der vorliegenden Erfindung. Mitumfaßt sind die Sense- und Antisense-Primer codierend für die Aminosäuresequenz TDRHSDVG.

Ein nächster Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von rekombinant hergestellten Enzymen mit gegenüber dem Wildtyp erhöhter NAD(H)-Akzeptanz. Dies wird dadurch erreicht, daß man unter Beibehaltung der basischen Aminosäuren in der Coenzymbindungsstelle des Enzyms mindestens eine neutrale Aminosäure gegen mindestens eine saure austauscht.

Ganz allgemein setzt das erfindungsgemäße Verfahren zur Abwandlung der Enzyme die Kenntnis bzw. einleitende Bestimmung der zu verändernden Aminosäuresequenz des zu verbessernden Enzyms voraus, um einen gezielten Austausch der entsprechenden Aminosäuren vornehmen zu können. Der für die NAD(H)-Spezifitätsverbesserung nützliche Austausch ergibt

sich aber auch dann - ohne Vorabkenntnisse der Coenzymbindungsstelle - nach dem trial-and-error-Prinzip, wobei derzeit kommerziell zur Verfügung stehende Fertig-Kits die wesentlichen Teilschritte der gentechnologischen Arbeiten ohne allzu großen Aufwand möglich machen (s. Fachkataloge von Qiagen oder Clontech).

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren auf eine Dehydrogenase, vorzugsweise eine Alkoholdehydrogenase, besonders bevorzugt auf die rec-(R)-ADH aus *L. brevis* oder *L. kefir* angewandt. Man erhält so vorteilhafte rekombinante Mutanten(rec-Mutanten) der (R)-ADHs (Muteine) aus besagten Organismen. Ganz besonders bevorzugt sind solche rec-(R)-ADHs aus *L. brevis* oder *L. kefir*, bei denen an Position 38 ein G gegen ein D als Aminosäure ausgetauscht wird. Bei der Positionsangabe ist die Startaminosäure entsprechend dem Codon ATG mitgezählt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung beschäftigt sich mit der Verwendung eines erfindungsgemäßen rec-Enzyms in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomer angereicherten organischen Verbindungen, vorzugsweise enantiomer angereicherte Alkohole.

Vorzugsweise wird die rec-(R)-ADH aus *L. brevis* oder *L. kefir* in einem Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von Ketonen oder zur enantioselektiven Oxidation von Alkoholen eingesetzt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen rec-Enzyme erfolgt nach dem Fachmann bekannten gentechnologischen Verfahren (z.B. Sambrook et al. 1989 s.o.; Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. R.L. Rodriguez & D.T. Denhardt, Eds: 205-225). Bezüglich der allgemeinen Vorgehensweise (PCR und Fusions-PCR, Klonierung, Expression) sei auf die WO99/47684 und das dort zitierte verwiesen.

Der Nachweis der positiven Veränderung der mutierten rec-Enzyme kann durch die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Coenzyme NAD^+ , NADP^+ , NADH und NADPH über die ent-

sprechenden kinetischen Parameter für das Keton-Substrat erfolgen.

Am Beispiel der rec-(R)-ADH aus *L. brevis* wird im folgenden die Erfindung (Beispielteil) und deren Vorteile dargestellt.

Vergleicht man biochemisch diejenigen Mutanten, die nach der Anmeldung WO99/47684 erzeugt wurden mit der hier beschriebenen erfindungsgemäßen rec-(R)-ADH, zeigen sich bei der Mutante G38D folgende vorteilhafte Verbesserungen:

- 10 Die Mutante zeigt eine beträchtlich verbesserte Temperaturstabilität, dieses Enzym ist sogar deutlich stabiler als das nicht-mutierte NADP(H)-umsetzende Wildtyp-Enzym;

Der K_m -Wert ist höher und damit die Affinität schlechter geworden für NADP gegenüber dem Wildtypenzym, dagegen ist 15 der K_m -Wert für NAD niedriger und damit die Affinität verbessert worden.

Die Stabilität des Plasmids, das das Gen für die Mutante G38D enthält, ist deutlich besser als die der Plasmide mit den nach WO99/47684 erzeugten Genen;

- 20 Die Ausbeute bei der Expression des Gens, das den Austausch für G38D (+ ATG Startcodon) enthält, ist beträchtlich höher als die der nach WO99/47684 erzeugten Enzyme.

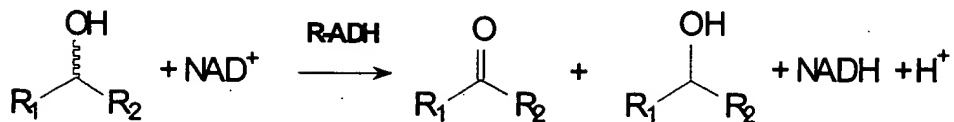
Diese durch einen einzigen Austausch erzeugten neuen Eigenschaften der erfindungsgemäßen rec-(R)-ADH ergeben ein Enzym, das für präparative Anwendungen gut geeignet ist. Es 25 akzeptiert das kostengünstigere und stabilere NAD(H) an Stelle von NADP(H), weist selbst eine hohe Stabilität auf und zeigt vorteilhafte biochemische Eigenschaften. Es kann eingesetzt werden sowohl für Reduktionen von Ketonen zu 30 chiralen Alkoholen (Gleichung (1)) als auch für Oxidationsreaktionen (Gl. (2)). Neben Ketonen werden auch Ketoester (z.B. α -, β -, γ -Ketoester) sehr gut genommen.

(1)



(R)-Alkohol

(2)



5

(R,S)-Alkohol

(S)-Alkohol

Für präparative Anwendungen nach Gleichung (1) ist die Möglichkeit der Verwendung von NADH besonders vorteilhaft, da für die erforderliche Regenerierung von NADH eine etablierte Standardmethode (Formiat/Formiat-Dehydrogenase) existiert. Da die Bindungsstelle für Ketone bzw. Alkohole durch die Mutation nicht verändert worden ist, kann die bekannte große Anwendungsbreite der rec-(R)-ADH unter Verwendung von NAD(H) in vollem Umfang ausgenutzt werden.

15 Gensequenzen, welche für Aminosäuresequenzen codieren, umfassen alle Sequenzen, die nach Maßgabe der Degeneration des genetischen Codes möglich erscheinen.

Enantiomer angereichert bezeichnet im Rahmen der Erfindung die Tatsache, daß eine optische Antipode im Gemisch beider zu >50% vorhanden ist.

20

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Rekombinant hergestelltes Enzym mit verbesserter
NAD(H)-Akzeptanz

<130> 000277 AM

10 <140>
<141>

<160> 3

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 759

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
rec-(R)-Alkoholdehydrogenase

25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(759)

30

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | tct | aac | cgt | ttg | gat | ggg | aag | gta | gca | atc | att | aca | ggg | ggg | acg | 48 |
| Met | Ser | Asn | Arg | Leu | Asp | Gly | Lys | Val | Ala | Ile | Ile | Thr | Gly | Gly | Thr | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |

35

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ttg | ggg | atc | ggg | tta | gct | atc | gcc | acg | aag | ttc | gtt | gaa | gaa | ggg | gct | 96 |
| Leu | Gly | Ile | Gly | Leu | Ala | Ile | Ala | Thr | Lys | Phe | Val | Glu | Glu | Gly | Ala | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |

40

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| aag | gtc | atg | att | acc | gac | cgg | cac | agc | gat | gtt | ggg | gaa | aaa | gca | gct | 144 |
| Lys | Val | Met | Ile | Thr | Asp | Arg | His | Ser | Asp | Val | Gly | Glu | Lys | Ala | Ala | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |

45

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| aag | agt | gtc | ggc | act | cct | gat | cag | att | caa | ttt | ttc | caa | cat | gat | tct | 192 |
| Lys | Ser | Val | Gly | Thr | Pro | Asp | Gln | Ile | Gln | Phe | Phe | Gln | His | Asp | Ser | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |

50

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| tcc | gat | gaa | gac | ggc | tgg | acg | aaa | tta | ttc | gat | gca | acg | gaa | aaa | gcc | 240 |
| Ser | Asp | Glu | Asp | Gly | Trp | Thr | Lys | Leu | Phe | Asp | Ala | Thr | Glu | Lys | Ala | |
| | | 65 | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ttt | ggc | cca | gtt | tct | aca | tta | gtt | aat | aac | gct | ggg | atc | gcg | gtt | aac | 288 |
| Phe | Gly | Pro | Val | Ser | Thr | Leu | Val | Asn | Asn | Ala | Gly | Ile | Ala | Val | Asn | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | | 95 | |

55

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| aag | agt | gtc | gaa | gaa | acc | acg | act | gct | gaa | tgg | cgt | aaa | tta | tta | gcc | 336 |
| Lys | Ser | Val | Glu | Glu | Thr | Thr | Thr | Ala | Glu | Trp | Arg | Lys | Leu | Leu | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | 110 | |

| | | |
|----|---|-----|
| | gtc aac ctt gat ggt gtc ttc ttc ggt acc cga tta ggg att caa cgg | 384 |
| | Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg | |
| | 115 120 125 | |
| 5 | atg aag aac aaa ggc tta ggg gct tcc atc atc aac atg tct tcg atc | 432 |
| | Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile | |
| | 130 135 140 | |
| 10 | gaa ggc ttt gtg ggt gat cct agc tta ggg gct tac aac gca tct aaa | 480 |
| | Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Ser Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys | |
| | 145 150 155 160 | |
| 15 | ggg gcc gta cgg att atg tcc aag tca gct gcc tta gat tgt gcc cta | 528 |
| | Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu | |
| | 165 170 175 | |
| 20 | aag gac tac gat gtt cgg gta aac act gtt cac cct ggc tac atc aag | 576 |
| | Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys | |
| | 180 185 190 | |
| 25 | aca cca ttg gtt gat gac cta cca ggg gcc gaa gaa gcg atg tca caa | 624 |
| | Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Pro Gly Ala Glu Glu Ala Met Ser Gln | |
| | 195 200 205 | |
| 30 | cgg acc aag acg cca atg ggc cat atc ggt gaa cct aac gat att gcc | 672 |
| | Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala | |
| | 210 215 220 | |
| 35 | tac atc tgt gtt tac ttg gct tct aac gaa tct aaa ttt gca acg ggt | 720 |
| | Tyr Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asn Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly | |
| | 225 230 235 240 | |
| 40 | tct gaa ttc gta gtt gac ggt ggc tac act gct caa tag | 759 |
| | Ser Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln | |
| | 245 250 | |
| 45 | <210> 2 | |
| | <211> 252 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Künstliche Sequenz | |
| | <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: | |
| | rec-(R)-Alkoholdehydrogenase | |
| 50 | <400> 2 | |
| | Met Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Thr | |
| | 1 5 10 15 | |
| | Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala | |
| | 20 25 30 | |
| 55 | Lys Val Met Ile Thr Asp Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala | |
| | 35 40 45 | |
| | Lys Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe Phe Gln His Asp Ser | |
| | 50 55 60 | |
| | Ser Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Ala Thr Glu Lys Ala | |
| | 65 70 75 80 | |
| | Phe Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Asn | |
| | 85 90 95 | |
| | Lys Ser Val Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp Arg Lys Leu Ala | |
| | 100 105 110 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Asn | Leu | Asp | Gly | Val | Phe | Phe | Gly | Thr | Arg | Leu | Gly | Ile | Gln | Arg |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| | Met | Lys | Asn | Lys | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Ile | Ile | Asn | Met | Ser | Ser | Ile |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 5 | Glu | Gly | Phe | Val | Gly | Asp | Pro | Ser | Leu | Gly | Ala | Tyr | Asn | Ala | Ser | Lys |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | Gly | Ala | Val | Arg | Ile | Met | Ser | Lys | Ser | Ala | Ala | Leu | Asp | Cys | Ala | Leu |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| | Lys | Asp | Tyr | Asp | Val | Arg | Val | Asn | Thr | Val | His | Pro | Gly | Tyr | Ile | Lys |
| 10 | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| | Thr | Pro | Leu | Val | Asp | Asp | Leu | Pro | Gly | Ala | Glu | Glu | Ala | Met | Ser | Gln |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| | Arg | Thr | Lys | Thr | Pro | Met | Gly | His | Ile | Gly | Glu | Pro | Asn | Asp | Ile | Ala |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| 15 | Tyr | Ile | Cys | Val | Tyr | Leu | Ala | Ser | Asn | Glu | Ser | Lys | Phe | Ala | Thr | Gly |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| | Ser | Glu | Phe | Val | Val | Asp | Gly | Gly | Tyr | Thr | Ala | Gln | | | | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | | |

20

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Aminosäuresequenz der Primer

30

<400> 3

Thr Asp Arg His Ser Asp Val Gly

1

5

35

Beispiele:

Der Ergebnisteil gliedert sich in folgende Abschnitte:

- 1) Beschreibung der Herstellung der Mutante recADHG38D
- 2) Charakterisierung der neuen NAD-Mutante recADHG38D
- 5 3) Vergleich der biochemischen Eigenschaften der neuen Mutante mit einer Mutante hergestellt nach WO99/47684 und dem Wildtypenzym.
- 4) Substratspektrum und Nachweis der Enantiospezifität der Mutante

10

Beispiel 1) Beschreibung der Herstellung der Mutante recADHG38D:

Als Templat diente für die Herstellung dieser Mutante das Gen des Wildtypenzyms, das kloniert in E.coli vorliegt.

- 15 Ausgehend von der Primärsequenz des Wildtypenzyms und unter Berücksichtigung der Kenntnis der Raumstruktur dieser Wildtyp-ADH wurden genetische Primer definiert und verwendet, so dass mit der Methode der „Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)“ an der Position 38 ein Austausch von Glycin nach As-
- 20 paraginsäure durchgeführt wurde.

Primer für die gerichtete Mutagenese der Änderung der Co-faktorspezifität von NADP nach NAD (der gewünschte Aminosäure-Austausch ist kursiv hervorgehoben):

5'Primer mit dem Aminosäureaustausch G38Ds:

5'ACC GAC CGG CAC AGC GAT GTT GGT 3'

T D R H S D V G

3'Primer mit dem Aminosäureaustausch G38Das:

5 5'ACC AAC ATC GCT GTG CCG GTC GGT 3'

G V D S H R D T

Um eine Mutation erfolgreich durchzuführen, muss der für den Aminosäureaustausch verantwortliche Nucleotidaustausch auf beiden DNA-Strängen erfolgen, sowohl auf dem leading strand (s = sense) als auch auf dem lagging strand (as = antisense). Für die Mutations-PCR bedeutet dies, dass 2 Genstücke generiert werden, einer vom N-Terminus des Gens bis zum Aminosäureaustausch und einer vom Aminosäureaustausch bis zum C-Terminus des Gens. Diese beiden Genstücke haben dann einen überlappenden Bereich im oben genannten Primer mit dem Aminosäureaustausch, d.h. die oben genannten Aminosäuren von TDRHSDVG haben beide Genstücke gemeinsam. Über diesen gemeinsamen Bereich können die beiden Genstücke dann in einer 2., sogenannten Fusions-PCR, fusioniert werden.

PCR mit den neuen mutationsspezifischen Primern zur Herstellung des kurzen und langen Fragments:

| PCR | Template | 5'Primer | 3'Primer | dNTP | Puffer | DNAzyme | H ₂ O | Temp. |
|-----|-------------------|------------------|-------------------|-------|--------|---------|------------------|-------|
| 1 | recADH WT 2µl | G38Ds 100pmol | Bras 100pmol | 16 µl | 10 µl | 0.5 µl | 69.5 µl | 56°C |
| 2 | recADH WT 2 µl | BRs 100pmol | G38Das 100pmol | 16 µl | 10 µl | 0.5 µl | 69.5 µl | 56°C |

Die aus dieser PCR entstandenen Genstücke wurden in der Fusions-PCR zusammengesetzt. Dazu wurden gleiche pmol-Enden an Templat aus PCR 1 und PCR 2 zusammenpipettiert und ansonsten die gleichen Zutaten eingesetzt wie oben, ausser
 5 den Primern.

Die ersten 5 Cyclen der PCR wurden ohne jegliche Primer durchgeführt, nach dem 5. Cyclus wurden je 100 pmol von BRs (N-Terminus des Gens) und BRas (C-Terminus des Gens) hinzugeführt, und weitere 25 Cyclen absolviert. Durch die ersten
 10 5 Cyclen ohne Primer wurde gewährleistet, dass nur fusionierte Genstücke als Templat für die Polymerase dienen können. Die Amplifikation setzte dann nach 5 Cyclen mit Zugabe der genspezifischen Primer ein.

Auf diese Weise können Gene mit Punktmutationen auf beiden
 15 DNA-Strängen generiert werden.

| Fusions PCR | Templ-ate | 5'Primer | 3'Primer | dNTP | Puf-fer | DNAzyme | H ₂ O | Temp |
|-------------|------------------------------------|----------------|-----------------|-------|---------|---------|------------------|------|
| 3 | PCR 1 1pmol + PCR 2 1pmol | BRs 100pmol | BRAS 100pmol | 16 µl | 10 µl | 0.5 µl | 59.5 µl | 52°C |

Das Fusionsprodukt (= recADH-MuteinG38D) wurde aus dem Gel isoliert (Gel Extraction Kit, Qiagen) und aufgereinigt. Anschliessend wurde das Gen entsprechend seiner angefügten N- und C-terminalen Restriktionsschnittstellen (Eco R1 und
 20 HindIII) geschnitten und erneut über Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. (Für nähere Beschreibung siehe Patent WO99/47684).

Der hier verwendete kommerzielle Vektor pBTAC2 (Roche Diagnostics; früher Boehringer Mannheim, s. Fig. 7) wurde
 25

ebenfalls mit EcoRI und HindIII restringiert, und somit für die Klonierung mit dem Vektor vorbereitet.

Klonierung in den Vektor pBTac2:

- 5 Das restringierte Mutein wurde mittels des Rapid Ligation Kits (Fa. Roche Diagnostics) in den Vektor pBTAC2 ligiert und anschliessend in kompetente E.coli JM105 Zellen transformiert (60 sec 42°C Heatshock) (wahlweise auch in E. coli SG13009 Zellen (Qiagen), die zusätzliche Repressorplasmide mit Neomycinresistenz enthalten, Plasmid pREP4, kommerziell erhältlich von Qiagen).

Die erfolgreich transformierten Klone wurden auf ihre Expressionsleistung hin getestet.

Expression des Muteins G38D:

- 15 Das Mutein wurde mit 1 mM IPTG bei OD 0.5 im Schüttelkolben (LB-Medium) induziert, und die Zellen nach 24 h Expression geerntet. Als Selektionsdruck fungiert Ampicillin.

- 20 Das Mutein G38D wurde mit sehr guter Expressionsleistung gebildet, sie war vergleichbar mit der Expression des Wildtyp-Enzyms. Im Rohextrakt der rekombinanten Zellen wurde ca. 30-40 % des gesamten Proteins als rekombinantes ADH-Mutein G38D gebildet, die Volumenaktivität (getestet mit Acetophenon/NADH) beträgt 23 U/ml.

Beispiel 2) Reinigung und biochemische Charakterisierung der Mutante recADHG38D:

Das Mutein wurde bis zum nahezu homogenen Protein aufgereinigt und charakterisiert.

5 Reinigung der recADH-MuteinG38D:

Der das Mutein enthaltende E. coli-Stamm wurde mit 0.1 M Na-acetat pH 4.5 aufgeschlossen (Glasperlenaufschluss, IMA Disintegrator S, 4000 rpm, 20 min, 4°C) und der Zellbrei anschliessend bei 13000 rpm zentrifugiert (Sorvall SS34 Rotor, 4°C, 10 min). Der zellfreie Überstand enthält das Enzym (Rohextrakt). Dieser Rohextrakt wurde mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 0.6 M eingestellt und auf eine mit 50 mM TEA pH 7.0 + 0.6 M Ammoniumsulfat + 1 mM MgCl_2 equilibrierte Phenylsepharosesäule (25 ml SV, Pharmacia) aufgetragen. Das Protein wurde mit einem fallenden Salzgradienten bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, und über Ultrafiltration (Amicon Rührzelle) eingeengt. Dieser aktive Pool wurde mit Ammoniumsulfat bis 1.2 M versetzt, und auf eine gegen 50 mM TEA pH 7.0 + 1 mM MgCl_2 + 1.2 M Ammoniumsulfat equilibrierte Octylsepharosesäule aufgegeben. Das Protein wurde erneut mit einem fallenden Gradienten bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Das aktive Eluat dieser Säule wurde für die Charakterisierungen verwendet.

Reinigungstabelle:

| Probe | Aktivität [U/ml] | Protein [mg/ml] | spez. Akt. [U/mg] | Ausbeute [%] | Faktor | Σ U |
|------------|------------------|-----------------|-------------------|--------------|--------|-----|
| Rohextrakt | 23.2 | 5.78 | 4.02 | 100 | 1 | 511 |
| Phenyls. | 50 | 17.18 | 2.88 | 19 | 0.71 | 98 |
| Octyls. | 8.36 | 1.22 | 6.85 | 4 | 1.7 | 20 |

SDS-PAGE der MuteinG38D - Reinigung (Fig.1):

| | | |
|---|----|----------------|
| 1 | RE | 115 µg |
| 5 | 2 | PS 340 µg |
| | 3 | Octyl1 31.6 µg |
| | 4 | Octyl2 48.8 µg |

Wie aus der Abbildung ersichtlich, wird das Mutein G38D der recADH stark überexprimiert, die geringere Volumenaktivität gegenüber dem Wildtyp beruht nicht auf einer schwächeren Expressionsleistung. Spur 4 entspricht dem gewählten Octylpool in der obigen Reinigungstabelle.

Charakterisierung der recADH Mutein G38D:

15 Das Mutein wurde in bezug auf pH-Optimum, pH-Stabilität, Temperaturoptimum, Temperaturstabilität, Km-Werte für die oxidative Richtung, Kcat, und Kcat/Km charakterisiert.

Diese Kriterien wurden in Vergleich gesetzt zum Wildtypenzym und auch zu dem Mutein 2 (Mutante 2; recADH R39L, K49M, A10G (mit zusätzlichem Startcodon gezählt) die in 20 der Anmeldung WO99/47684 erzeugt und beschrieben ist.

pH-Optimum des Muteins G38D (Fig. 2):

Das pH-Optimum des Muteins, das pH-Optimum der Reduktionsrichtung liegt bei 5.5, das der Oxidationsrichtung bei 6.5

5 pH-Stabilität des Muteins G38D (Fig. 3):

Die pH-Stabilität wurde je nach pH-Bereich in unterschiedlichen Puffern durchgeführt, das Enzym ist stabil für mindestens 24 h zwischen 6.5 und 8.5, dabei ist deutlich zu sehen, dass sich TEA Puffer nicht für die Lagerstabilität eignet. Der Puffer zeigt bei gleichen pH-Werten immer niedrigere Werte an als die anderen.

Temperaturstabilität (Fig. 4):

Die Temperaturstabilität wurde mit Proben, die +/- 50 % Glycerin (Endkonzentration) enthielten, durchgeführt. 50 µl Enzymprobe wurde mit ausreichend Paraffinöl überschichtet, um ein Verdampfen bei hohen Temperaturen zu verhindern. Glycerin ist für eine längere Stabilität des Enzyms unbedingt notwendig, da es sonst bei Temperaturen um 50°C denaturiert. Im Vergleich wurde das Wildtypenzym mit Glycerin gemessen, die Mutante 2 (R39L K49M A10G; WO99/47684) ohne Glycerinzusatz.

Die Temperaturstabilität wurde bei 42°C gemessen, die Halbwertszeit des Muteins beträgt 257 h mit Glycerinzusatz.

| t, min | A, U/ml | ln A | ln A calc. | A calc., U/ml |
|-------------------------|------------|-------------|------------|---------------|
| 0 | 15 | 2,7080502 | 2,36981758 | 10,695441 |
| 1440 | 7,48 | 2,01223279 | 2,30501677 | 10,0243463 |
| 2880 | 8,12 | 2,09433015 | 2,24021596 | 9,39536008 |
| 4320 | 9,2 | 2,21920348 | 2,17541515 | 8,8058401 |
| 11520 | 6,74 | 1,90805992 | 1,8514111 | 6,36880021 |
| Steigung:= | | -4,5001E-05 | | |
| Achsensab- schnitt:= | 2,36981758 | | | |

zugehörige Tabelle zur Fig. 4

Die Temperaturstabilität des Muteins wurde bei 30°C gemessen, die Halbwertszeit beträgt 148h (Fig. 5).

5

| t, min | A, U/ml | ln A | ln A calc. | A calc., U/ml |
|--------|---------|------------|------------|---------------|
| 0 | 15 | 2,7080502 | 2,65518596 | 14,2276316 |
| 1440 | 11,32 | 2,42657107 | 2,54298444 | 12,7175693 |
| 2880 | 11,24 | 2,41947884 | 2,43078292 | 11,3677787 |
| 4320 | 11,14 | 2,41054223 | 2,3185814 | 10,1612493 |
| 11520 | 5,7 | 1,74046617 | 1,7575738 | 5,79835233 |

zugehörige Tabelle zu Fig. 5

Temperaturoptimum:

Das Temperaturoptimum wurde im Testansatz in der Küvette bestimmt. Gemessen wurde die Aktivität mit Acetophenon und NADH (Fig. 6). Das Temperaturoptimum des Muteins G38D liegt
5 bei 40°C.

**Beispiel 3) Vergleich der biochemischen Eigenschaften
der Mutante recADHG38D mit einer Mutante hergestellt nach
WO99/47684 und dem Wildtypenzym**

10 Die Km-Werte und alle sich auf Km- bzw. Vmax-Werte beziehenden Daten werden in der nachfolgenden Gesamttabelle dargestellt, die Berechnung der Werte erfolgte mittels nicht-linearer Regression mit dem Programm ORIGIN.

15 Tabelle: Zusammenfassung und Vergleich aller Charakteristika der Muteine G38D und Mutante 2 (WO99/47684) mit dem Wildtypenzym

| Charakteristika | Wildtypenzym | Mutante 2 | Mutein G38D |
|--|---------------|---------------|---------------|
| pH Opt. Redukt. | 6,5 | 6,5 | 5,5 |
| pH Opt. Oxid. | 8,0 | 6,5 | 6,5 |
| pH Stab. 24 h | 4,5-9,0 (70%) | 5,5-8,5 (70%) | 6,5-8,5 (80%) |
| Temp.opt. [°C] | 55 | 50 | 40 |
| Temp.stab.30°C | 150 h * | 16,5 h | 148 h * |
| Temp.stab.42°C | 7,15 h * | 0,19 h | 257 h * |
| Km NAD [mM] | 2,94 | 0,77 | 0,89 |
| Km NADP [mM] | 0,24 | 0,11 | 14,04 |
| Vmax NAD [nMol/ml*s] | 467 | 439 | 236 |
| Vmax NADP [nMol/ml*s] | 1420 | 623 | 402 |
| kcat NAD [s ⁻¹] | 21,4 | 33,11 | 34,57 |
| kcat NADP [s ⁻¹] | 65,2 | 46,98 | 58,88 |
| kcat/Km NAD [s ⁻¹ *mM ⁻¹] | 7,3 | 43 | 38,84 |
| kcat/Km NADP [s ⁻¹ *mM ⁻¹] | 270 | 427 | 4 |
| NAD:NADP*** | 0,03:1 | 0,1:1 | 10:1 |

* mit 50 % Glycerin

*** Berechnet wurde das Verhältnis von kcat/Km für NAD zu kcat/Km für NADP als quantitatives Maß für die Akzeptanz der beiden Coenzyme.

Die Verbesserungen des Muteins G38D liegt in einer deutlich verbesserten Akzeptanz von NAD. Die zusammenfassende Tabelle stellt klar, daß das Wildtyp-Enzym NAD nur in einem Verhältnis von 0,03 : 1 umsetzen kann, während das vorab beschriebene neue Mutein NAD 10-fach besser nimmt als NADP. Darüberhinaus hat das erfindungsgemäße Mutein eine deutlich verbesserte Temperaturstabilität gegenüber dem Wildtypenzym (beide mit Glycerin im Puffer gemessen), insbesondere bei höheren Temperaturen (42°C). Die Temperaturstabilitäten sind immer als Halbwertszeiten dargestellt, wobei $t_{1/2}$ die Zeit bestimmt, wo noch 50 % Restaktivität zu messen sind. Eine gute Temperaturstabilität wird allgemein als Maß für eine gute Langzeitstabilität unter Produktionsbedingungen angesehen.

15

Beispiel 4) Substratspektrum der Mutante recADHG38D

Es ist bekannt, daß das NADP(H)-abhängige Wildtyp-Enzym eine Vielzahl von Ketonen, Ketoestern und anderen Carbonylgruppen-enthaltenden Verbindungen stereospezifisch reduzieren kann. Im folgenden werden nur einige wenige ausgewählte Ketoverbindungen als Substrate getestet, um zu bestätigen, daß sich die Substraterkennungsregion durch die Veränderung der Coenzym-Bindungsstelle nicht prinzipiell geändert hat. Dazu werden die Ketoverbindungen in folgendem Ansatz getestet (1 ml Gesamtvolumen):

25

10 mM Keto-Substrat; 1 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$; 0,4 mM NADH; 960 μ l Triethanolamin-Puffer, 50 mM, pH 7,0; 10 μ l Enzym (Mutein G38D); partiell gereinigt (Phenylsepharose; s.o.).

Die Aktivität wird photometrisch bei 340 nm (30°C) bestimmt. Die folgende Tabelle faßt die Aktivitätswerte zusammen.

30

Tab.: Substratspektrum der NAD-Mutante G38D (Aktivitäten relativ auf Acetophenon (=21,08 U/ml) bezogen)

| Substrat | Aktivität, relativ [%] |
|--|---------------------------|
| Acetophenon | 100 |
| 4-Cl-Acetophenon | 68 |
| 2-Hexanon | 169 |
| 2-Heptanon | 207 |
| 2-Methylcyclohexanon | 334 |
| Acetessigsäure-methylester | 188 |
| Acetessigsäure-ethylester | 88 |
| 4-Chlor-acetessigsäureethylester | 228 |
| Brenztraubensäure-methylester | 191 |
| Brenztraubensäure-ethylester | 260 |
| 2-Oxobuttersäureethylester | 137 |
| 3-Methyl-2-oxobuttersäure- ethylester | 84 |
| Benzylpyruvatethylester | 13 |
| Phenylglyoxylsäuremethylester | 10 |
| 3-Oxovaleriansäuremethylester | 127 |

Beispiel 5) Nachweis der Stereoselektivität der recADH Mutein G38D:

Für einzelne, ausgewählte Keto-Substrate soll die Enantiomerenreinheit des durch Reduktion gebildeten Produkts nachgewiesen werden. Dazu werden die Substrate unter Coenzym-Regenerierung weitgehend vollständig umgesetzt und die Enantiomerenreinheit des Produkts mittels Gas-Chromatografie bestimmt.

Umsetzung (1 ml gesamt):

10 10 mM Keto-Substrat; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 1 mM NADH; 100 mM Na-formiat; 0,8 U Formiat-Dehydrogenase; 2 U NAD-Mutante (Units mit Acetophenon/NADH photometrisch bestimmt); 680 μl Triethanolamin-Puffer, 50 mM, pH 7,0.

15 Nach 30 und 120 min werden jeweils Proben entnommen (50 μl), mit 100 μl Ethylacetat zum Extrahieren des Produkts versetzt und die Ethylacetat-Phase (1 μl) für die GC-Analytik verwendet. Die Enantiomerentrennung durch GC wird für jedes Produkt durch Applikation des Racemats überprüft. Die Reinheit des Produkt wird als ee-Wert angegeben nach:

20
$$\text{ee(R)} = [\text{R}] - [\text{S}] / [\text{R}] + [\text{S}]$$

Ist kein S-Enantiomer nachweisbar, wird der ee-Wert als >99% angegeben.

GC-Analytik:

Säule: CP-Chirasil-DEX CB Länge: 25 m, Durchmesser: 25 μ m
(Fa. Chrompack). Temperaturprogramm: 5 min bei 60°C, dann
5°C/min bis auf 190°C (Für Hexanon/Hexanol: 30 min bei 60°C,
5 dann 10°C/min auf 195°C). Säulenfluß 1,3 ml/min; Gas: Helium

Die folgende Tabelle faßt die Daten zur Produktreinheit zusammen.

10 Tab.: Nachweis der Enantiomerenreinheit der durch enzymatische Reduktion gebildeten Produkte

| Substrat (Retentionszeit) | Retentionszeit des Produkts | ee-Wert [%] des Produkts |
|--|-----------------------------|--------------------------|
| Acetophenon (16,92 min) | 20,82 min | >99% |
| 4-Cl-Acetophenon (21,84 min) | 25,74 min | >99% |
| 2-Oxobuttersäureethylester (10,39 min) | 13,91 min | >99% |
| 2-Hexanon | 21,77 min | >99% |
| 2-Heptanon | 14,22 min | >99% |

Patentansprüche:

1. Rekombinant hergestelltes Enzym mit gegenüber dem Wildtyp erhöhter NAD(H)-Akzeptanz, dadurch gekennzeichnet, daß
5 unter Beibehaltung der basischen Aminosäuren in der Coenzymbindungsstelle des Enzyms mindestens eine neutrale Aminosäure gegen mindestens eine saure ausgetauscht ist.
2. rec-Enzym nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
10 es sich um eine Dehydrogenase, vorzugsweise eine Alkoholdehydrogenase handelt.
3. rec-Enzym nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
15 es sich um eine rec-(R)-ADH aus *L. brevis* oder *L. kefir* handelt.
4. rec-Enzym nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch G38D betrifft.
- 20 5. Gensequenz codierend für ein rec-Enzym gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4.
6. Plasmid aufweisend die Gensequenz nach Anspruch 5.
7. Mikroorganismus aufweisend die Gensequenz nach Anspruch 5.
- 25 8. Sense- und Antisense-Primer codierend für: TDRHSDVG
9. Verfahren zur Herstellung eines rec-Enzyms gemäß Anspruch 1, 2, 3 und/oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß
30 man unter Beibehaltung der basischen Aminosäuren in der Coenzymbindungsstelle des Enzyms mindestens eine

neutrale Aminosäure gegen mindestens eine saure austauscht.

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
5 es sich um eine Dehydrogenase, vorzugsweise eine Alkoholdehydrogenase, besonders bevorzugt um die rec-(R)-ADH aus *L. brevis* oder *L. kefir* handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
10 der Austausch G38D betrifft.
12. Verwendung eines rec-Enzyms gemäß Anspruch 1, 2, 3 und/oder 4 in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomer angereicherten organischen Verbindungen.
13. Verwendung des rec-Enzyms gemäß Anspruch 3 und/oder 4
15 in einem Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von Ketonen oder zur enantioselektiven Oxidation von Alkoholen.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung richtet sich auf rekombinant her-
gestelltes Enzym mit gegenüber dem Wildtyp erhöhter NAD(H)-
Akzeptanz. Dies wird durch Beibehaltung der basischen Ami-
5 nosäuren in der Coenzymbindungsstelle des Enzyms und Aus-
tausch mindestens einer neutralen Aminosäure gegen minde-
stens eine saure erreicht.

Gensequenzen, Plasmide, Primer, Verfahren und Verwendung.

Fig. 1:

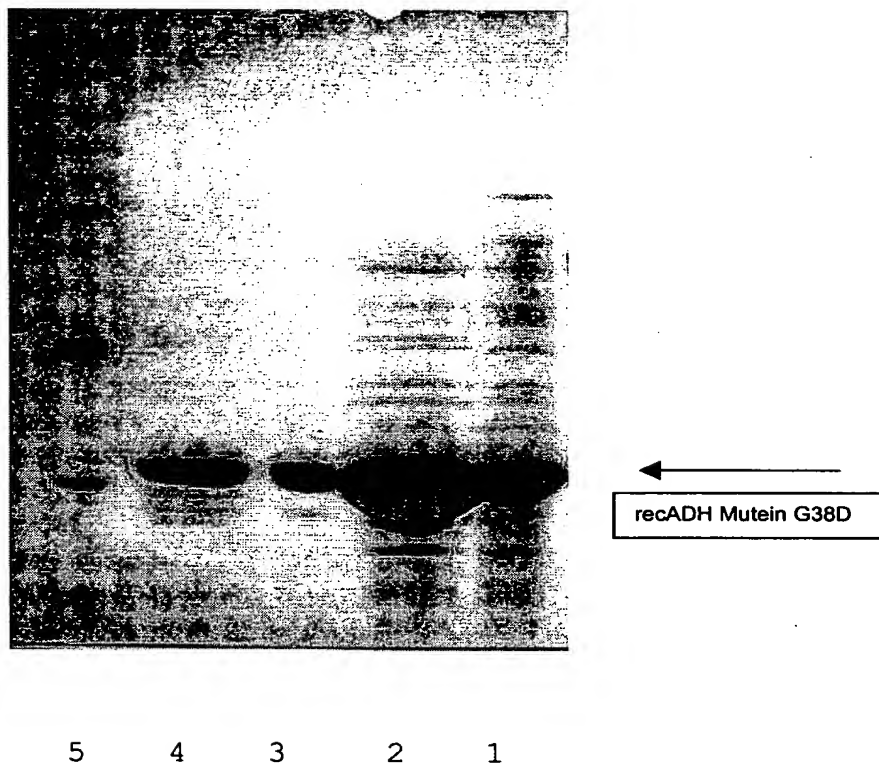


Fig. 2:

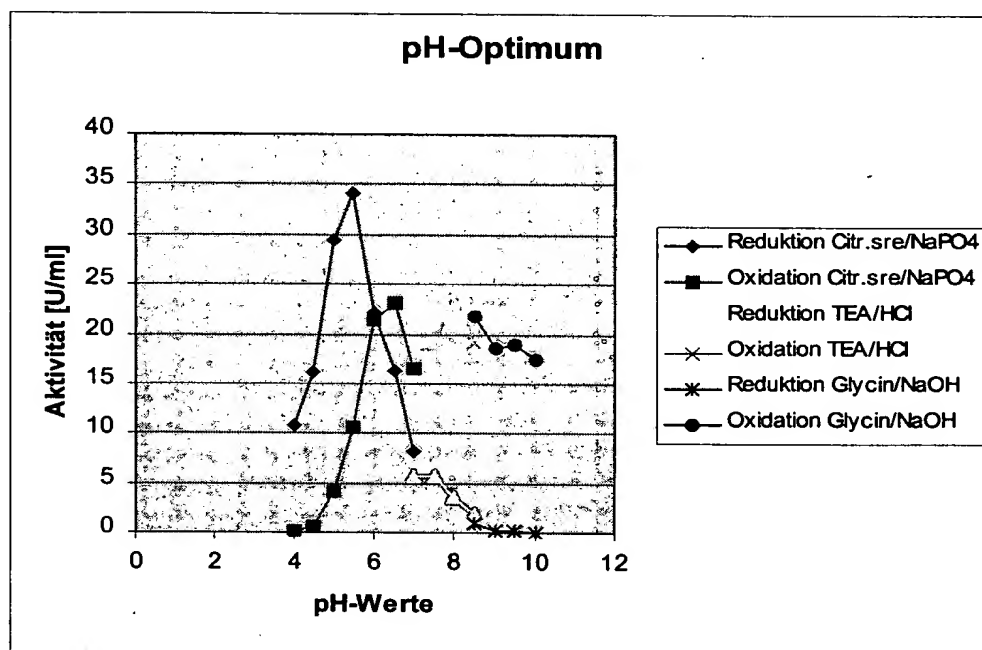


Fig. 3

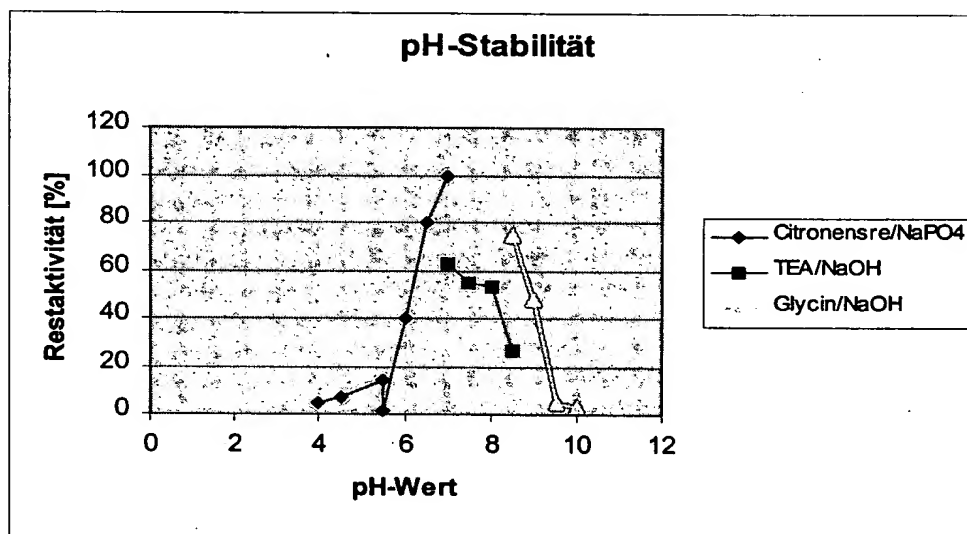


Fig. 4

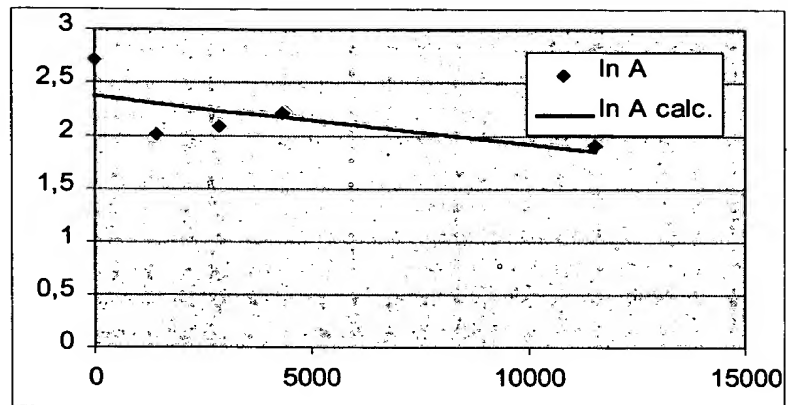


Fig. 5:

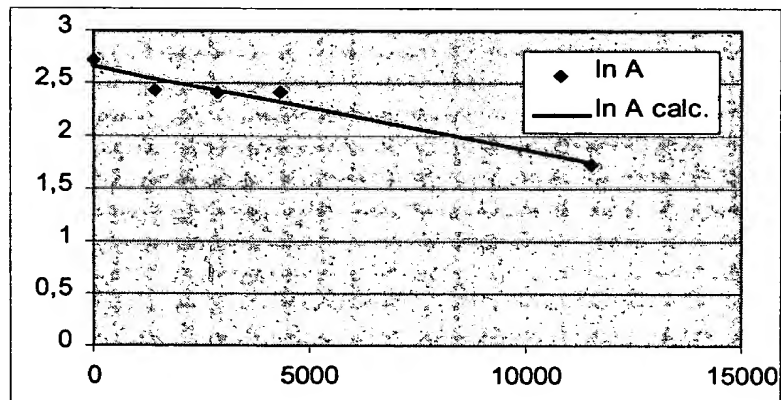


Fig. 6:

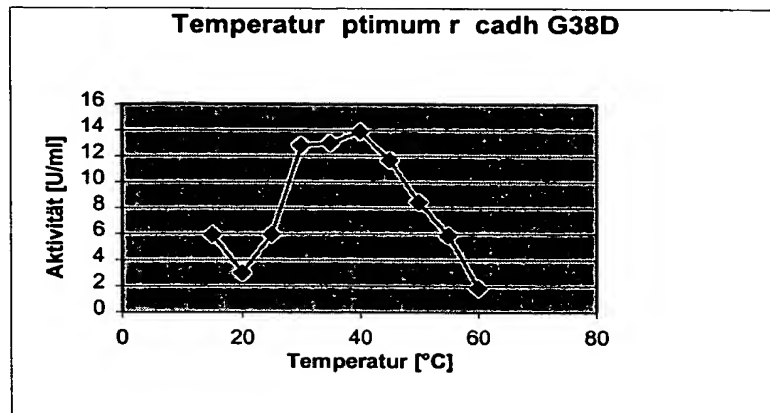
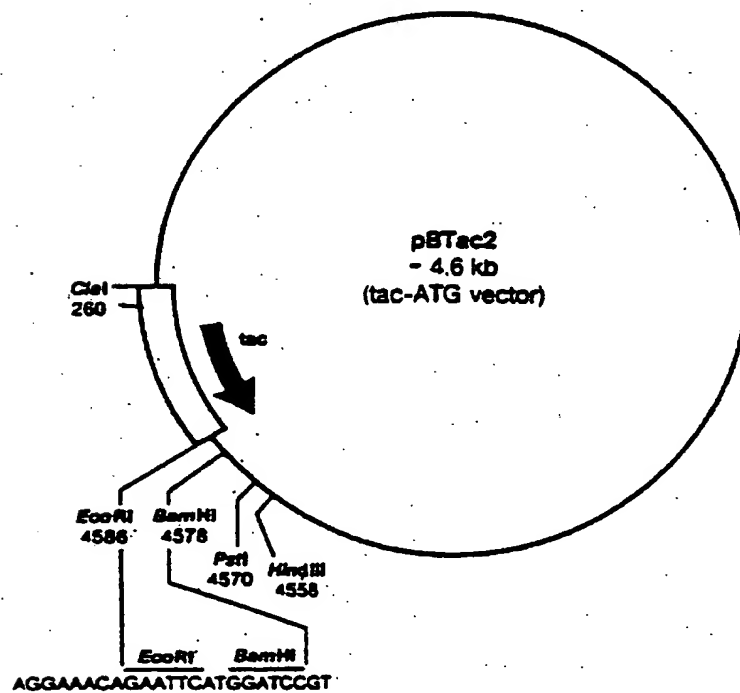


Fig. 7:



Restriction map of pBTac2 DNA:

**Recombinantly prepared enzymes having
improved NAD(H) acceptance**

The present invention relates to a recombinantly (rec) prepared enzyme. In particular, the invention relates to such an enzyme in which the NAD(H) acceptance is increased compared with the wild type. Furthermore, the invention relates to the gene sequences coding for the rec-enzyme, to plasmids and microorganisms which contain these gene sequences, to advantageous primers, to a method for preparation of the enzymes and to the use thereof.

The use of enzyme techniques in the synthesis of organic compounds is advantageous on the large industrial scale precisely because they are often superior to the normal chemical techniques as regards selectivities and product yields.

In some cases, such enzyme techniques are dependent on so-called cofactors or coenzymes. For example, alcohol dehydrogenases (ADH) are enzymes which transform ketones to the corresponding alcohols with high enantioselectivity. The coenzyme in such reactions is very often NADH or NADPH. Most known ADHs (for example, from horse liver, or from the bacterium *Thermoanaerobium brockii*) form (S)-alcohols during use of comparable ketones. Nevertheless, two (R)-specific ADHs which are biochemically very similar are known from *Lactobacillus* strains, one being an enzyme from *Lactobacillus kefir* (European Patent 91107067.0; German Patent 4014573) and the other from *L. brevis* (European Patent 0796914 A2; German Patent 19610984; DSM 20054).

A restriction in the use of these two R-specific enzymes exists due to the dependence on the coenzyme NADP(H). This coenzyme is considerably more unstable and more expensive than the coenzyme NAD(H), in addition to which an established and cost-effective regeneration method does not exist. Because of the abnormally

broad acceptance for ketones, which are transformed with almost complete enantiomeric purity by these enzymes, they are nevertheless of great interest for preparative applications.

In attempts described in the literature to shift the coenzyme specificity of NADP(H) toward NAD(H), what has taken place heretofore has been predominantly "multiple" replacements of relatively large regions, which do not allow any systematic procedure to be discerned and which cannot be adopted for other NADP(H)-dependent enzymes (Chen, R. et al. (1995), "A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**(25): 11666-70; Perham, R. N. et al. (1991), "New enzymes for old: redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase", Bioassays **13**(10): 515-25; Yaoi, T. et al. (1996), "Conversion of the coenzyme specificity of isocitrate dehydrogenase by module replacement", J. Biochem. (Tokyo) **119**(5): 1014-8). Only one publication (Sem, D. S. and C. B. Kasper (1993), "Interaction with arginine 597 of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase is a primary source of the uniform binding energy used to discriminate between NADPH and NADH", Biochemistry **32**(43): 11548-58) describes a singular replacement on a dehydrogenase (cytochrome P450 oxidoreductase), although this was achieved in a manner analogous to that of WO99/47648. The authors replaced a basic amino acid by a neutral amino acid (Arg597Met). The results of the authors confirm a slight improvement of NAD acceptance, but the obtained enzyme is clearly more unstable.

Further attempts have been made with genetic engineering methods to change the enzyme from *L. brevis* such that it can accept not only NADP(H) but also NAD(H) (WO99/47648). Therein, in order to achieve this change in coenzyme acceptance, basic amino acids were substantially replaced by neutral amino acids at the coenzyme binding site. This replacement was achieved by changing

the nucleotide sequence coding for the (R)-ADH from *L. brevis*. Thus the basic amino acids arginine-38, lysine-45 and lysine-48 were replaced in various combinations by neutral amino acids (such as methionine, leucine, isoleucine, glycine) in the region of the coenzyme binding site (the amino acid positions enumerated here include the start codon ATG). As it happens, such mutants of the enzyme indeed also accept NAD(H), but prove to have little value for practical application, since the enzyme yields are relatively low and, in particular, the stabilities of these new kinds of enzymes are considerably poorer than those of the NADP(H)-dependent wild-type enzyme. Even a further mutant, in which an additional replacement of a neutral amino acid by an acidic amino acid (G38D) had been undertaken in addition to the above-mentioned replacements of basic amino acids by neutral amino acids (replacements R39L, K48M as well as the charge-neutral replacement A9G), indeed exhibited broadening of the coenzyme acceptance toward NAD(H), but was also considerably unstable and obtainable only with low yields.

The object of the present invention was therefore to specify a general method and enzymes obtained by means of this method which makes it possible to increase the, inherently unnatural NAD(H) acceptance of the enzymes without at least substantially impairing their stability.

This object is achieved by specification of the rec-enzymes having the characterizing features of claim 1. Claims 2 to 4 place preferred rec-enzymes under protection. Claims 5 to 8 are related to the gene sequences coding for these rec-enzymes, to plasmids and microorganisms containing these gene sequences as well as to preferred primers. Claims 9 to 11 present the inventive method, while claims 12 and 13 characterize preferred uses of the rec-enzymes.

By the fact that at least one neutral amino acid is replaced by at least one acidic amino acid while retaining the basic amino acids at the coenzyme binding site of the enzyme, there is obtained a recombinantly prepared enzyme with increased NAD(H) acceptance compared with the wild type.

The previously existing natural preference for the unstable coenzyme NADP(H) can therefore be shifted toward the preferred and advantageous NAD(H) acceptance by the replacement of only one amino acid. This cannot be inferred as such from the prior art, and is therefore very surprising. In experiments, it has been found that the acceptance for NAD(H) compared with NADP(H) in the inventive mutant can be increased by a factor of about 300 by this replacement, without impairing the stability of the rec-enzyme. To the contrary, the thermal stability is even increased.

By means of the inventive method, all NADP(H)-dependent enzymes known to the person skilled in the art can in principle be appropriately tuned. Preferably such an enzyme is a dehydrogenase, especially an alcohol dehydrogenase. Even more especially, however, this is achieved for the (R)-ADH from *L. brevis* or *L. kefir*. In this way, rec-(R)-ADHs with the advantages cited hereinabove are advantageously obtained from the said organisms. Most especially preferred are such rec-(R)-ADHs from *L. brevis* or *L. kefir* in which a G was replaced by a D as the amino acid at position 38. As regards the position identification, the start amino acid corresponding to the codon ATG is included in the count.

A further embodiment of the invention relates to gene sequences which code for an inventive rec-enzyme.

Subject matter of the invention is also plasmids and microorganisms containing the inventive gene sequences.

The microorganism in which the gene sequence is cloned is used for multiplication and production of an adequate quantity of the

recombinant enzyme. The methods for this purpose are well known to the person skilled in the art (Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Balbas P & Bolivar F., 1990, Design and construction of expression plasmid vectors in *E. coli*, Methods Enzymology 185, 14-37). In principle, all organisms known for this purpose by the person skilled in the art can be used as the microorganisms. Preferably *E. coli* strains will be used for this purpose. Especially preferred are: *E. coli* NM 522, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10 or HB101. Plasmids with which the gene construct containing the inventive gene sequence is preferably cloned in the host organism are: pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac (Roche Biochemicals), pKK-233 (Stratagene) or pET (Novagen). Further options are also known in principle by the person skilled in the art (see the literature cited hereinabove, or at any rate the corresponding specialized molecular biology catalogs).

The primer strands necessary for the PCR form a further part of the present invention. The sense and antisense primers coding for the amino acid sequence TDRHSDVG are also included.

One of the next aspects of the invention relates to a method for preparation of recombinantly prepared enzymes with NAD(H) acceptance increased compared with the wild type. This is achieved by the fact that at least one neutral amino acid is replaced by at least one acidic amino acid, while retaining the basic amino acids at the coenzyme binding site of the enzyme. Very generally, the inventive method for modification of the enzyme requires advance knowledge or preliminary determination of the amino acid sequence to be changed in the enzyme to be improved, in order to be able to achieve selective replacement of the corresponding amino acids. The replacement that is effective for improvement of NAD(H) specificity is also ascertained, however, by the trial-and-error principle - without prior

knowledge of the coenzyme binding site - for which purpose ready-to-use kits that are now commercially available make it possible to perform the most important subordinate steps of the genetic engineering studies without too much time and effort (see specialized catalogs of Qiagen or Clontech).

The inventive method is preferably applied to a dehydrogenase, especially an alcohol dehydrogenase, and especially preferably to the rec-(R)-ADH from *L. brevis* or *L. kefir*. In this way recombinant mutants (rec-mutants) of the (R)-ADHs (muteins) are advantageously obtained from the said organisms. Most especially preferred are such rec-(R)-ADHs from *L. brevis* or *L. kefir* in which a G is replaced by a D as the amino acid at position 38. As regards the position identification, the start amino acid corresponding to the codon ATG is included in the count.

A further aspect of the invention is related to the use of an inventive rec-enzyme in a method for preparation of enantiomerically enriched organic compounds, preferably enantiomerically enriched alcohols.

Preferably the rec-(R)-ADH from *L. brevis* or *L. kefir* is used in a method for enantioselective reduction of ketones or for enantioselective oxidation of alcohols.

The preparation of the inventive rec-enzymes is achieved by genetic engineering methods known to the person skilled in the art (for example, Sambrook et al., 1989, loc cit.; Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, R.L. Rodriguez & D.T. Denhardt, Eds.: 205-225). As regards the general procedure, (PCR and fusion PCR, cloning, expression), see WO99/47684 and that cited therein.

The positive change of the mutated rec-enzymes can be demonstrated by determination of the kinetic parameters for the coenzymes NAD⁺, NADP⁺, NADH and NADPH via the corresponding kinetic parameters for the ketone substrate.

The invention (examples part) and its advantages will be explained hereinafter with reference to the example of rec-(R)-ADH from *L. brevis*.

From biochemical comparison of those mutants produced according to International Patent Application WO99/47684 with the inventive rec-(R)-ADH described here, the following advantageous improvements are apparent in the G38D mutant.

The mutant has considerably better thermal stability, this enzyme even being much more stable than the non-mutated (NADP(H)-converting wild-type enzyme;

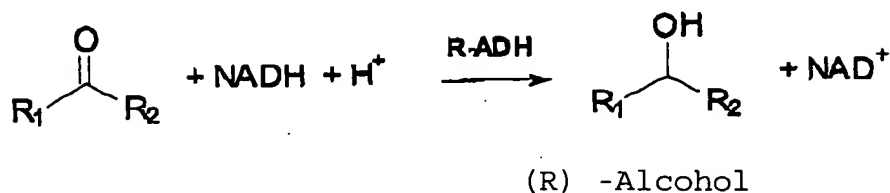
The K_m value is higher and thus the affinity for NADP has become poorer compared with the wild-type enzyme, but in contrast the K_m value for NAD has become lower and thus the affinity has been improved.

The stability of the plasmid which contains the gene for the G38D mutant is much better than that of the plasmids with genes produced according to WO99/47684;

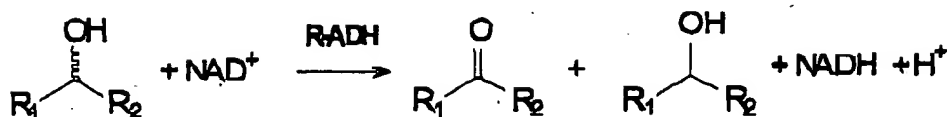
The yield during expression of the gene which contains the G38D replacement (+ ATG start codon) is much higher than that of the enzymes produced according to WO99/47684.

These new properties of the inventive rec-(R)-ADH achieved by a single replacement lead to an enzyme which is highly suitable for preparative applications. It accepts the more cost-effective and more stable NAD(H) instead of NADP(H), even has high stability and exhibits advantageous biochemical properties. It can be used both for reductions of ketones to chiral alcohols (equation (1)) and for oxidation reactions (equation (2)). In addition to ketones, keto esters (such as α -, β -, γ -keto esters) are accepted very effectively.

(1)



(2)



(R,S) -Alcohol

(S) -Alcohol

For preparative applications according to equation (1), the option of using NADH is particularly advantageous, since an established standard method (formate/formate dehydrogenase) exists for the necessary regeneration of NADH. Since the binding site for ketones or alcohols has not been changed by the mutation, the known broad range of application of the rec-(R)-ADH can be fully exploited using NAD(H).

Gene sequences which code for amino acid sequences include all sequences which seem possible on the basis of degeneration of the genetic code.

In the scope of the invention, enantiomerically enriched means the fact that, in the mixture of two optical antipodes, one is present in a proportion of >50%.

000277 AM

9

SEQUENCE RECORD

<120> Recombinantly prepared enzyme with improved
NAD(H) acceptance

<170> PatentIn Ver. 2.1

<213> Artificial sequence

<223> Description of the artificial sequence:
rec-(R)-alcohol dehydrogenase

<400> 1
atg tct aac cgt ttg gat ggt aag gta gca atc att aca ggt ggt acg 48
Met Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
ttg ggt atc ggt tta gct atc gcc acg aag ttc gtt gaa gaa ggg gct 96
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20 25 30
aag gtc atg att acc gac cgg cac ago gat gtt ggt gaa aaa gca gct 144
Lys Val Met Ile Thr Asp Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35 40 45
aag agt gtc ggc act cct gat cag att caa ttt ttc caa cat gat tct 192
Lys Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe Phe Gln His Asp Ser
50 55 60
tcc gat gaa gac ggc tgg acg aaa tta ttc gat gca acg gaa aaa gcc 240
Ser Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Ala Thr Glu Lys Ala
65 70 75 80
ttt ggc cca gtt tct aca tta gtt aat aac gct ggg atc gcg gtt aac 288
Phe Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Asn
85 90 95
aag agt gtc gaa gaa aac acg act gct gaa tgg cgt aaa tta tta gcc 336
Lys Ser Val Glu Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ala
100 105 110

000277 AM

10

| | |
|---|-----|
| gtc aac ctt gat ggt gtc ttc ttc ggt acc cga tta ggg att caa cgg Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg 115 120 125 | 384 |
| atg aag aac aaa ggc tta ggg gct tcc atc atc aac atg tct tcg atc Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile 130 135 140 | 432 |
| gaa ggc ttt gtg ggt gat cct agc tta ggg gct tac aac gca tct aaa Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Ser Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys 145 150 155 160 | 480 |
| ggg gcc gta cgg att atg tcc aag tca gct gcc tta gat tgt gcc cta Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu 165 170 175 | 528 |
| aag gac tac gat gtt cgg gta aac act gtt cac cct ggo tac atc aag Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys 180 185 190 | 576 |
| aca cca ttg gtt gat gac cta cca ggg gcc gaa gaa gcg atg tca caa Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Pro Gly Ala Glu Glu Ala Met Ser Gln 195 200 205 | 624 |
| cgg acc aag acg cca atg ggc cat atc ggt gaa cct aac gat att gcc Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala 210 215 220 | 672 |
| tac atc tgt gtt tac ttg gct tot aac gaa tct aaa ttt gca acg ggt Tyr Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asn Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly 225 230 235 240 | 720 |
| tct gaa ttc gta gtt gac ggt ggc tac act gct caa tag Ser Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln 245 250 | 759 |

<213> Artificial sequence

<223> Description of the artificial sequence:
rec-(R)-alcohol dehydrogenase

<400> 2

| |
|--|
| Met Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Thr 1 5 10 15 |
| Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala 20 25 30 |
| Lys Val Met Ile Thr Asp Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala 35 40 45 |
| Lys Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe Phe Gln His Asp Ser 50 55 60 |
| Ser Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Ala Thr Glu Lys Ala 65 70 75 80 |
| Phe Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Asn 85 90 95 |
| Lys Ser Val Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ala 100 105 110 |

000277 AM

11

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Asn | Leu | Asp | Gly | Val | Phe | Phe | Gly | Thr | Arg | Leu | Gly | Ile | Gln | Arg |
| | 115 | | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Met | Lys | Asn | Lys | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Ile | Ile | Asn | Met | Ser | Ser | Ile |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Glu | Gly | Phe | Val | Gly | Asp | Pro | Ser | Leu | Gly | Ala | Tyr | Asn | Ala | Ser | Lys |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Gly | Ala | Val | Arg | Ile | Met | Ser | Lys | Ser | Ala | Ala | Leu | Asp | Cys | Ala | Leu |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | | 175 |
| Lys | Asp | Tyr | Asp | Val | Arg | Val | Asn | Thr | Val | His | Pro | Gly | Tyr | Ile | Lys |
| | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Thr | Pro | Leu | Val | Asp | Asp | Leu | Pro | Gly | Ala | Glu | Glu | Ala | Met | Ser | Gln |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Arg | Thr | Lys | Thr | Pro | Met | Gly | His | Ile | Gly | Glu | Pro | Asn | Asp | Ile | Ala |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Tyr | Ile | Cys | Val | Tyr | Leu | Ala | Ser | Asn | Glu | Ser | Lys | Phe | Ala | Thr | Gly |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Ser | Glu | Phe | Val | Val | Asp | Gly | Gly | Tyr | Thr | Ala | Gln | | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | | |

<213> Artificial sequence

<223> Description of the artificial sequence:
Amino acid sequence of the primer

<400> 3

Thr Asp Arg His Ser Asp Val Gly
1 5

000277 AM

12

Examples:

The results part is divided into the following sections:

- 1) Description of preparation of the mutant recADHG38D
- 2) Characterization of the new NAD mutant recADHG38D
- 3) Comparison of the biochemical properties of the new mutant with a mutant prepared according to WO99/47684 and the wild-type enzyme
- 4) Substrate spectrum and demonstration of the enantioselectivity of the mutant

**Example 1) Description of preparation of the mutant
recADHG38D:**

The template used for preparation of this mutant was the gene of the wild-type enzyme present as a clone in *E. coli*.

Starting from the primary sequence of the wild-type enzyme, and taking into consideration the knowledge of the spatial structure of this wild-type ADH, genetic primers were defined and used in such a way that a replacement of glycine by aspartic acid was performed at position 38 with the "polymerase chain reaction" method (PCR).

Primers for the directed mutagenesis of the change of cofactor specificity from NADP to NAD (the desired amino acid replacement is indicated in bold italics):

000277 AM

13

5'-Primer with the G38Ds amino acid replacement:

5'ACC GAC CGG CAC AGC GAT GTT GGT 3'
T D R H S D V G

3'-Primer with the G38Das amino acid replacement:

5'ACC AAC ATC GCT GTG CCG GTC GGT 3'
G V D S H R D T

In order to perform a mutation successfully, the nucleotide replacement responsible for the amino acid replacement must take place on both DNA strands, both on the leading strand (s = sense) and on the lagging strand (as = antisense). For the mutation PCR this means that 2 gene fragments are generated, one from the N-terminus of the gene up to the amino acid replacement, and one from the amino acid replacement to the C-terminus of the gene. These two gene segments then have an overlapping region in the aforesaid primer containing the amino acid replacement, or in other words the two gene fragments have in common the aforesaid amino acids of TDRHSDVG. Via this common region, the two gene fragments can then be fused in a second PCR, known as fusion PCR.

PCR with the new mutation-specific primers for preparation of the short and long fragments:

| PCR | Template | 5'Primer | 3'Primer | dNTP | Buffer | DNAzyme | H ₂ O | Temp. |
|-----|-------------------|------------------|-------------------|-------|--------|---------|------------------|-------|
| 1 | recADH WT 2µl | G38Ds 100pmol | Bras 100pmol | 16 µl | 10 µl | 0.5 µl | 69.5 µl | 56 °C |
| 2 | recADH WT 2 µl | BRs 100pmol | G38Das 100pmol | 16 µl | 10 µl | 0.5 µl | 69.5 µl | 56 °C |

The gene fragments produced by this PCR are joined in the fusion PCR. For this purpose equal pmol ends of template from PCR 1 and PCR 2 were pipetted together and otherwise the ingredients as above were used, except for the primers.

The first 5 cycles of the PCR were performed without any primer, and after the 5th cycle 100 pmol of BRs (N-terminus of the gene) and BRas (C-terminus of the gene) were added and a further 25 cycles performed. By virtue of the first 5 cycles without primer, it was ensured that only fused gene fragments can function as the template for the polymerase. Amplification then began after 5 cycles, with addition of the gene-specific primer.

In this way, genes with point mutations can be generated on both DNA strands.

| Fusion PCR | Template | 5'Primer | 3'Primer | dNTP | Buffer | DNAzyme | H ₂ O | Temp. |
|------------|------------------------------------|----------------|-----------------|------------|------------|-------------|------------------|-------|
| 3 | PCR 1 1pmol + PCR 2 1pmol | BRs 100pmol | BRAS 100pmol | 16 μ l | 10 μ l | 0.5 μ l | 59.5 μ l | 52 °C |

The fusion product (= G38D mutein of recADH) was isolated from the gel (Gel Extraction Kit, Qiagen) and purified. The gene was then cut corresponding to its joined N-terminal and C-terminal restriction cut points (Eco R1 and HindIII) and again isolated by gel electrophoresis and purified. (See Patent WO99/47684 for a more detailed description).

The commercial vector pBTAC2 used here (Roche Diagnostics; formerly Boehringer Mannheim, see Fig. 7) was also restricted

000277 AM

15

with EcoR1 and HindIII, and thus was prepared for cloning with the vector.

Cloning in the vector pBTac2:

The restricted mutein was ligated into the vector pBTAC2 by means of the Rapid Ligation Kit (Roche Diagnostics) and then transformed in competent *E. coli* JM105 cells (60 sec, 42°C heatshock) (or alternately also in *E. coli* SG13009 cells (Qiagen), which contain additional repressor plasmids with neomycin resistance, plasmid pREP4, commercially available from Qiagen).

The successfully transformed clones were tested as to their expression capability.

Expression of the G38D mutein:

The mutein was induced with 1 mM IPTG at OD 0.5 in shaking flasks (LB medium) and the cells were harvested after 24 hours of expression. Ampicillin was used for selection pressure.

The G38D mutein was formed with very good expression capability, comparable with the expression of the wild-type enzyme. In the raw extract of the recombinant cells, about 30 to 40% of the total protein was formed as recombinant ADH G38D mutein, and the volume activity (tested with acetophenone/NADH) was 23 U/ml.

Example 2) Purification and biochemical characterization of the mutant recADHG38D

The mutein was purified to almost homogeneous protein and characterized.

Purification of G38D mutein of recADH:

The *E. coli* strain containing the mutein was digested with 0.1 M Na acetate of pH 4.5 (glass-beads digestion, IMA disintegrator S, 4000 rpm, 20 minutes, 4°C) and the cell slurry was then centrifuged at 13000 rpm (Sorvall SS34 rotor, 4°C, 10 minutes). The cell-free supernatant contains the enzyme (raw extract). This raw extract was adjusted to 0.6 M with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and applied on a phenylsepharose column (25 ml SV, Pharmacia) equilibrated with 50 mM TEA of pH 7.0 + 0.6 M ammonium sulfate + 1 mM MgCl_2 . The protein was eluted with salt gradient decreasing to 0 M ammonium sulfate. The active fractions were united and concentrated by ultrafiltration (Amicon stirred cell). Ammonium sulfate up to 1.2 M was added to this active pool, whereupon the mixture was applied on an octylsepharose column equilibrated versus 50 mM TEA of pH 7.0 + 1 mM MgCl_2 + 1.2 M ammonium sulfate. The protein was eluted once again with a gradient decreasing to 0 M ammonium sulfate. The active eluate of this column was used for characterization studies.

Purification table:

| Sample | Activity [U/ml] | Protein [mg/ml] | Specific activity [U/mg] | Yield [%] | Factor | Σ U |
|------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------|--------|------------|
| Raw extract | 23.2 | 5.78 | 4.02 | 100 | 1 | 511 |
| Phenyl-sepharose | 50 | 17.18 | 2.88 | 19 | 0.71 | 98 |
| Octyl-sepharose | 8.36 | 1.22 | 6.85 | 4 | 1.7 | 20 |

SDS PAGE of the G38D mutein purification (Fig. 1):

| | | |
|---|--------|--------------|
| 1 | RE | 115 μ g |
| 2 | PS | 340 μ g |
| 3 | Octyl1 | 31.6 μ g |
| 4 | Octyl2 | 48.8 μ g |

As is evident from the graph, the G38D mutein of the recADH is strongly overexpressed, and the smaller volume activity compared with the wild type is not due to lower expression capability. Track 4 corresponds to the selected octyl pool in the above purification table.

Characterization of the G38D mutein of recADH:

The mutein was characterized with respect to pH optimum, pH stability, temperature optimum, thermal stability, K_m values for the oxidative direction, K_{cat} and K_{cat}/K_m .

These criteria were compared with the wild-type enzyme and also with mutein 2 (mutant 2: recADH R39L,K49M,A10G (counted with additional start codon), which is produced and described in Application W099/47684.

pH optimum of the G38D mutein (Fig. 2):

The pH optimum of the mutein: the pH optimum of the reduction direction is 5.5, that of the oxidation direction is 6.5.

pH stability of the G38D mutein (Fig. 3):

The pH stability for each pH range was determined in different buffers; the enzyme is stable for at least 24 hours between 6.5 and 8.5, its being clearly evident that TEA buffer is not suitable for storage stability. For equal pH values the buffer always exhibits lower values than the others.

Thermal stability (Fig. 4):

The thermal stability was determined with samples containing +/- 50% glycerol (final concentration). 50 μ l of enzyme sample was covered with sufficient paraffin oil to prevent evaporation at high temperatures. Glycerol is absolutely necessary for prolonged stability of the enzyme, since otherwise it becomes denatured at temperatures or around 50°C. In comparison, the wild-type enzyme was measured with glycerol and mutant 2 (R39L K49M A10G; WO99/47684) was measured without glycerol addition.

The thermal stability was measured at 42°C, the half-life of the mutein being 257 hours with glycerol addition.

000277 AM

19

| t, min | A, U/ml | ln A | ln A calc. | A calc., U/ml |
|----------------------|------------|-------------|------------|---------------|
| 0 | 15 | 2.7080502 | 2.36981758 | 10.695441 |
| 1440 | 7.48 | 2.01223279 | 2.30501677 | 10.0243463 |
| 2880 | 8.12 | 2.09433015 | 2.24021596 | 9.39536008 |
| 4320 | 9.2 | 2.21920348 | 2.17541515 | 8.8058401 |
| 11520 | 6.74 | 1.90805992 | 1.8514111 | 6.36880021 |
| Slope | | -4.5001E-05 | | |
| Intercept on axis | 2.36981758 | | | |

Table associated with Fig. 4

The thermal stability of the mutein was measured at 30°C, the half-life being 148 hours (Fig. 5)

| t, min | A, U/ml | ln A | ln A calc. | A calc., U/ml |
|--------|---------|------------|------------|---------------|
| 0 | 15 | 2.7080502 | 2.65518596 | 14.2276316 |
| 1440 | 11.32 | 2.42657107 | 2.54298444 | 12.7175693 |
| 2880 | 11.24 | 2.41947884 | 2.43078292 | 11.3677787 |
| 4320 | 11.14 | 2.41054223 | 2.3185814 | 10.1612493 |
| 11520 | 5.7 | 1.74046617 | 1.7575738 | 5.79835233 |

Table associated with Fig. 5

000277 AM

20

Temperature optimum:

The temperature optimum was determined in the test batch in the vessel. The activity was measured with acetophenone and NADH (Fig. 6). The temperature optimum of the G38D mutein is 40°C.

Example 3) Comparison of the biochemical properties of the mutant recADHG38D with a mutant prepared per W099/47684 and with the wild-type enzyme

The Km values and all data related to Km or Vmax values are presented in the following overall table; the calculation of the values was performed by means of nonlinear regression with the program ORIGIN.

Table: Summary and comparison of all characteristics of the G38D mutein and mutant 2 (W099/47684) with the wild-type enzyme

| Characteristics | Wild-type enzyme | Mutant 2 | G38D mutein |
|--|------------------|---------------|---------------|
| pH optimum for reduction | 6.5 | 6.5 | 5.5 |
| pH optimum for oxidation | 8.0 | 6.5 | 6.5 |
| pH for 24 hours stability | 4.5-9.0 (70%) | 5.5-8.5 (70%) | 6.5-8.5 (80%) |
| Temperature optimum [°C] | 55 | 50 | 40 |
| Thermal stability at 30°C | 150 h * | 16.5 h | 148 h * |
| Thermal stability at 42°C | 7.15 h * | 0.19 h | 257 h * |
| K _m NAD [mM] | 2.94 | 0.77 | 0.89 |
| K _m NADP [mM] | 0.24 | 0.11 | 14.04 |
| V _{max} NAD [nMol/ml*s] | 467 | 439 | 236 |
| V _{max} NADP [nMol/ml*s] | 1420 | 623 | 402 |
| k _{cat} NAD [s ⁻¹] | 21.4 | 33.11 | 34.57 |
| k _{cat} NADP [s ⁻¹] | 65.2 | 46.98 | 58.88 |
| k _{cat} /K _m NAD [s ⁻¹ *mM ⁻¹] | 7.3 | 43 | 38.84 |
| k _{cat} /K _m NADP [s ⁻¹ *mM ⁻¹] | 270 | 427 | 4 |
| NAD:NADP*** | 0.03:1 | 0.1:1 | 10:1 |

* with 50% glycerol

*** What was calculated was the ratio of k_{cat}/K_m for NAD to k_{cat}/K_m for NADP as a quantitative measure of the acceptance of the two coenzymes.

The improvement of the G38D mutein lies in distinctly improved acceptance of NAD. The summary table makes it clear that the wild-type enzyme can convert NAD only in a ratio of 0.03:1, whereas the new mutein described hereinabove accepts NAD 10 times better than NADP. Furthermore, the inventive mutein has distinctly improved thermal stability compared with the wild-type enzyme (both measured with glycerol in buffer), especially at higher temperatures (42°C). The thermal stabilities are always presented as half-lives, where $t_{1/2}$ denotes the time where the measured residual activity is still 50%. Good thermal stability is generally regarded as a measure of good long-term stability under production conditions.

Example 4) Substrate spectrum of the mutant recADHG38D

It is known that the NADP(H)-dependent wild-type enzyme can reduce numerous ketones, keto esters and other carbonyl-group-containing compounds stereospecifically. Hereinafter, only a few selected keto compounds are tested as substrates, in order to confirm that the substrate-recognition region has not been changed in principle by the change of coenzyme binding site. For this purpose the keto compounds are tested in the following mixture (total volume of 1 ml):

10 mM keto substrate; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.4 mM NADH; 960 μl of triethanolamine buffer, 50 mM, pH 7.0; 10 μl of enzyme (G38D mutein); partly purified (phenylsepharose; see above).

The activity is determined photometrically at 340 nm (30°C). The following table summarizes the activity values.

Table: Substrate spectrum of the NAD G38D mutant (activities expressed relative to acetophenone (= 21.08 U/ml))

| Substrate | Activity, relative [%] |
|--|---------------------------|
| Acetophenone | 100 |
| 4-Chloroacetophenone | 68 |
| 2-Hexanone | 169 |
| 2-Heptanone | 207 |
| 2-Methylcyclohexanone | 334 |
| Acetoacetic acid methyl ester | 188 |
| Acetoacetic acid ethyl ester | 88 |
| 4-Chloroacetic acid ethyl ester | 228 |
| Pyruvic acid methyl ester | 191 |
| Pyruvic acid ethyl ester | 260 |
| 2-Oxobutyric acid ethyl ester | 137 |
| 3-Methyl-2-oxobutyric acid ethyl ester | 84 |
| Benzyl pyruvate ethyl ester | 13 |
| Phenylglyoxylic acid methyl ester | 10 |
| 3-Oxovaleric acid methyl ester | 127 |

Example 5) Demonstration of the stereoselectivity of the G38D mutein of recADH:

The enantiomeric purity of the product formed by reduction will be demonstrated for individual, selected keto substrates. For this purpose the substrates are converted largely completely, accompanied by coenzyme regeneration, and the enantiomeric purity of the product is determined by means of gas chromatography.

Conversion (1 ml total):

10 mM keto substrate; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 mM NADH; 100 mM Na formate; 0.8 U of formate dehydrogenase; 2 U of NAD mutant (units determined photometrically with acetophenone/NADH); 680 μl of triethanolamine buffer, 50 mM, pH 7.0.

Samples (50 μl) are taken after 30 and 120 minutes respectively, 100 μl of ethyl acetate is added for extraction of the product, and the ethyl acetate phase (1 μl) is used for the GC analysis. Separation of the enantiomers by GC is checked for each product by application of the racemate. The purity of the product is expressed as the ee value, obtained as:

$$ee(R) = [R] - [S] / [R] + [S]$$

If S-enantiomer is not detectable, the ee value is given as > 99%.

000277 AM

25

GC analysis

Column: CP Chirasil DEX CB, length: 25 m, diameter: 25 μ m (Chrompack Co.). Temperature program: 5 minutes at 60°C, then 5°C/minute up to 190°C (for hexanone/hexanol: 30 minutes at 60°C, then 10°C/minute up to 195°C). Column flowrate 1.3 ml/minute; gas: helium.

The following table summarizes the data on product purity.

Table: Demonstration of enantiomeric purity of the products formed by enzyme reduction

| Substrate (retention time) | Retention time of the product | ee value [%] of the product |
|---|-------------------------------|-----------------------------|
| Acetophenone (16.92 min) | 20.82 min | > 99% |
| 4-Chloroacetophenone (21.84 min) | 25.74 min | > 99% |
| 2-Oxobutyric acid ethyl ester (10.39 min) | 13.91 min | > 99% |
| 2-Hexanone | 21.77 min | > 99% |
| 2-Heptanone | 14.22 min | > 99% |

Claims:

1. A recombinantly prepared enzyme with increased NAD(H) acceptance compared with the wild type, characterized in that at least one neutral amino acid is replaced by at least one acidic amino acid, while retaining the basic amino acids at the coenzyme binding site of the enzyme.
2. A rec-enzyme according to claim 1, characterized in that it is a dehydrogenase, especially an alcohol dehydrogenase.
3. A rec-enzyme according to claim 2, characterized in that it is a rec-(R)-ADH from *L. brevis* or *L. kefir*.
4. A rec-enzyme according to claim 3, characterized in that it relates to the G38D replacement.
5. A gene sequences coding for a rec-enzyme according to one or more of claims 1 to 4.
6. A plasmid containing the gene sequence according to claim 5.
7. A microorganism containing the gene sequence according to claim 5.
8. Sense and antisense primers coding for: TDRHSDVG.
9. A method for preparation of a rec-enzyme according to claim 1, 2, 3 and/or 4,

characterized in that
at least one neutral amino acid is replaced by at least one
acidic amino acid, while retaining the basic amino acids at
the coenzyme binding site of the enzyme.

10. A method according to claim 9,
characterized in that
it relates to a dehydrogenase, especially an alcohol
dehydrogenase, especially preferably the rec-(R)-ADH from *L.*
brevis or *L. kefir*.
11. A method according to claim 10,
characterized in that
it relates to the G38D replacement.
12. The use of a rec-enzyme according to claim 1, 2, 3 and/or 4
in a method for preparation of enantiomerically enriched
organic compounds.
13. The use of a rec-enzyme according to claim 3 and/or 4 in a
method for enantioselective reduction of ketones or for
enantioselective oxidation of alcohols.

000277 AM

28

Abstract:

The present invention relates to a recombinantly prepared enzyme with increased NAD(H) acceptance compared with the wild type, This is achieved by retaining the basic amino acids at the coenzyme binding site of the enzyme and replacing at least one neutral amino acid by at least one acidic amino acid.

Gene sequences, plasmids, primers, method and use.